

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

メタボローム解析を用いたウイルス性脳症患者血清中の バイオマーカー候補の検討

分担研究者 伊藤 嘉規 名古屋大学医学部小児科学・講師

研究要旨 小児期に発生頻度の高いウイルス性脳症における新規バイオマーカーを探索する目的で、インフルエンザ脳症およびヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)の代謝物プロファイルングをメタボローム解析にて検討した。血清中に検出された物質の中で、インフルエンザ脳症では5種類、HHV-6脳症では11種類の代謝物質の平均値に対照群と比較して有意な変化が認められ、新規バイオマーカー候補と考えられた。これらの中で、tryptophan-kynurenine代謝経路の中間産物であるキヌレニンと下流代謝物であるquinolinic acidは、2種の脳症に共通で神経毒性が報告されている物質であり、脳症へ進展する病態に關与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症では、感染に伴って惹起されるサイトカインなどの炎症性物質が病態に關与するとの報告があるが、なぜ脳症が起こるのか、どのようにして病態が進展するのかは十分に明らかにされていない。ヒトヘルペス6型(HHV-6)脳症は、日本の小児科領域において、インフルエンザ脳症に次いで発症数の多い急性脳炎/脳症である。インフルエンザ脳症と同様の病態が想定されるが、不明な部分が多い。そのため、病態に關連する新規のバイオマーカーの探索は臨床上の意義が大きい。インフルエンザ脳症とHHV-6脳症は共に、日本からの報告例が多い点が特徴的であり、共通の病態やバイオマーカーが存在する可能性も考えられる。近年、代謝プロファイルを解析する手法としてのメタボローム解析が注目されていることから、私共は、臨床検体として使用しやすい血清検体を用いて、インフルエンザ脳症・HHV-6脳症のメタボローム解析を試みた。

B. 研究方法

1. インフルエンザ脳症と診断した患者 12名と神経合併症のないインフルエンザ患者（コントロール群）22名の急性期および回復期血清を採取し、比較検討した（計68検体）。
2. HHV-6脳症と診断した患者9名、熱性けいれん例20名、および神経学的合併症のない急性発熱性疾患患者7名（対照群）の急性期血清を採取し、比較検討した（計

36検体）。

3. CE-TOFMS装置（キャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析、Agilent Technologies）を用いてカチオンモード、アニオンモードによる測定を行った。
4. 検出されたピークは自動積分ソフトウェアを用いて、ピーク情報を得た後、代謝物質データベースに登録された物質との照合・検索を行った。
5. 主成分分析、階層クラスター分析、代謝経路の描出を行った。
6. 定量系のあるものでは定量値を算出し同様に比較を行った。
7. 解析結果を群間で比較し、バイオマーカー候補の検討を行った。
8. インフルエンザ脳症については、quinolinic acidに関してさらに検討するため、インフルエンザ脳症18例、熱性けいれん例12例、神経合併症のない対照群25例で、血清中のquinolinic acid濃度を測定し、比較検討した。

C. 研究結果

1. インフルエンザ脳症では、血清68検体について、CE-TOFMSによるメタボローム解析を行い、174ピークに候補物質が付与された。HHV-6脳症では、血清36検体について、CE-TOFMSによるメタボローム解析を行い、159ピークに候補物質が付与された。
2. 検出されたピークを用いて主成分分析を行った（Data not shown）。階層クラスター

リングを行い、HeatMap 表示させた結果を得た。

- 候補化合物について、解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、プリン代謝経路、ピリミジン代謝経路、ニコチン酸・ニコチンアミド代謝経路および各種アミノ酸代謝経路に描画した。
- インフルエンザ脳症では 49 の物質で定量が可能であった。これらのうち、脳症群(急性期)では、コントロール群(急性期)と比較して、3 種類の代謝物質の平均値に有意な上昇がみられ、他方、2 種類で有意な低下が認められた(図 1)。上記の物質のなかで、kynurenine は、tryptophan-kynurenine 代謝経路の中間代謝物質で、神経毒性が報告されており、この代謝経路における解析結果を図 2 に示す。kynurenine の下流の代謝物である quinolinic acid について、症例数を増やして検討した結果、脳症群の血清で有意な上昇を認めた。
- HHV-6 脳症では、56 の物質で定量が可能であった。これらのうち、HHV-6 脳症群では、熱性けいれん群と比較して、4 種類の代謝物質の平均値に有意な上昇がみられ、他方、7 種類で有意な低下が認められた(図 1)。上記の物質のなかで、キヌレニンおよびキノリン酸は、トリプトファン-キヌレニン代謝経路の代謝物質で、神経毒性が報告されており、インフルエンザ脳症での解析と同様の結果が得られた。

D. 考察

メタボローム解析の結果を検討したところ、tryptophan-kynurenine 経路の代謝物である kynurenine と quinolinic acid が、インフルエンザ脳症・HHV-6 脳症の病態に共通して関係するバイオマーカー候補と考えられた。これらの代謝物は、中枢神経感染症、HIV 関連脳症、筋萎縮性側索萎縮症等で血清/髄液中の濃度上昇が報告されている。また、実験的に複数の作用機序による神経毒性も示されている。今後は、臨床的な応用の可能性についてさらに検討を加えていくことが重要と考えられる。

E. 結論

メタボローム解析の結果を検討したところ、トリプトファン-キヌレニン代謝経路の代謝物であるキヌレニン・キノリン酸が、病態に関係するバイオマーカー候補と考えられた。これらの代謝物は、私共が行ったイン

フルエンザ脳症を対象にした解析でもバイオマーカー候補として抽出されている。実験的に複数の作用機序による神経毒性も示されている。今後は、臨床的な応用の可能性についてさらに検討を加えていくことが重要と考えられる

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci*, 320:145-148,2012.
- Ito Y, Kimura H, Maeda Y, Hashimoto C, Ishida F, Izutsu K, Fukushima N, Isobe Y, Takizawa J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Okamura S, Kobayashi H, Yamaguchi M, Suzumiya J, Hyo R, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K, Suzuki R. Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Clin Cancer Res* 18(15):4183-4190, 2012.
- Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human Herpesvirus 6-Associated Encephalopathy in a Child with Dravet Syndrome. *Neuropediatrics*,44:155-158,2013.
- Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kojima S, Kimura H, Ito Y. Plasma Viral MicroRNA Profiles Reveal Potential Biomarkers for Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *J Infect Dis*. 208(5):771-779. 2013
- Hara S, Kawada J, Kawano Y, Yamashita T, Minagawa H, Okumura N, Ito Y. Hyperferritinemia in Neonatal and Infantile Human Parechovirus-3 Infection in Comparison with Other Infectious Diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(1):15-19, 2014.
- Yamashita Y, Ito Y, Isomura H, Takemura N, Okamoto A, Motomura K, Tsujiuchi T, Natsume A, Wakabayashi T, Toyokuni S, Tsurumi T. Lack of presence of the human cytomegalovirus in human

- glioblastoma. *Modern Pathol*, 27(7):922-9, 2014.
- 7) Kawano Y, Kawada J, Ito Y. Epstein-Barr Virus MicroRNAs in Plasma as Potential Biomarkers for Chronic Infections. *J Infect Dis* 209:1298-1300, 2014.
 - 8) Kanazawa T, Hiramatsu Y, Iwata S, Siddiquey M, Sato Y, Suzuki M, Ito Y, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-CCR4 Monoclonal Antibody Mogamulizumab for the Treatment of EBV-Associated T- and NK-Cell Lymphoproliferative Diseases. *Clin Cancer Res*, 20(19); 5075-84, 2014.

2. 学会発表

- 1) 伊藤嘉規、鳥居ゆか、森内浩幸、木村宏、先天性・周産期感染症（TORCH）に関する全国アンケート調査、第 115 回日本小児科学会学術集会、福岡、2012.4.21-22
- 2) 河野好彦、木村宏、後藤研誠、鈴木道雄、鳥居ゆか、伊藤嘉規、患者血漿中 EB ウイルス由来 mRNA 定量を応用した EB ウイルス関連疾患バイオマーカーの探索、第 86 回日本感染症学会総会、長崎、2012.4.25-26
- 3) 伊藤嘉規、小児科病棟での迅速診断とその応用-入院児のウイルス感染症早期診断と院内感染対策-、分野別シンポジウム 9、第 116 回日本小児科学会学術集会、広島、2013.4.19-21、日本小児科学会雑誌 117(2):S48, 2013
- 4) 鳥居ゆか、河野好彦、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、伊藤嘉規、メタボローム解析を用いたインフルエンザ脳症の新規バイオマーカーの探索、第 116 回日本小児科学会学術集会、広島、2013.4.19-21、日本小児科学会雑誌 117(2):158, 2013
- 5) 鳥居ゆか、河野好彦、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、伊藤嘉規、メタボローム解析によるインフルエンザ脳症患者血清中の代謝物プロファイリング、第 87 回日本感染症学会学術講演会、横浜、2013.6.5-6、感染症学雑誌 87(臨時増刊号):330, 2013
- 6) Yuka Torii, Yoshihiko Kawano, Hajime Sato, Tamaki Fujimori, Kazunori Sasaki, Jun-ichi Kawada, Yoshiaki Ohashi. Yoshinori Ito, Quantitative metabolome profiling reveals novel potential biomarkers in influenza-associated encephalopathy, IDWeek 2013, San Francisco, USA, October 2-6, 2013
- 7) Yoshihiko Kawano, Yuka Torii, Hajime Sato, Tamaki Fujimori, Kazunori Sasaki, Jun-ichi Kawada, Yoshiaki Ohashi, Yoshinori Ito, Quantitative metabolome profiling reveals novel potential biomarkers in human herpesvirus 6 encephalopathy, IDWeek 2013, San Francisco, USA, October 2-6, 2013
- 8) 鳥居ゆか、河野好彦、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、伊藤嘉規、メタボローム解析を用いたインフルエンザ脳症・HHV-6 脳症における新規バイオマーカーの探索、第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会、札幌、2013.10.26
- 9) 伊藤嘉規、単純ヘルペスウイルスによる母子感染、第 117 回日本小児科学会学術集会、名古屋、2014.4.11-13.

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし